

## **5 Diskussion**

### **5.1 Experiment 1: Effekte einer Hypothyreose und Hyperthyreose auf die Schilddrüsenhormonkonzentrationen ( $T_3/T_4$ )**

#### **5.1.1 Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum**

Bei der hypothyreoten Stoffwechsellage waren die  $T_3$ -Serumkonzentrationen stark erniedrigt und die  $T_4$ -Serumkonzentrationen nicht mehr messbar. Das zeigt, dass die Behandlung mit Methimazol offenbar erfolgreich war und tatsächlich eine Hypothyreose induziert wurde (siehe Abb. 4.1 und 4.2).

Die Behandlung mit  $T_3$  führte zu einer massiven Erhöhung der  $T_3$ -Serumkonzentrationen, welches zeigt, dass eine supraphysiologische Dosis von  $T_3$  verabreicht wurde. Gleichzeitig führt die Hyperthyreose mit  $T_3$  zu nicht messbaren  $T_4$ -Konzentrationen im Serum, weil  $T_3$  durch negatives Feedback die Ausschüttung von TRH, TSH und  $T_4$  am Hypothalamus, an der Hypophyse und an der Schilddrüse hemmt. Durch diese negative Rückkopplung findet keine  $T_4$ -Sekretion aus der Schilddrüse mehr statt und somit sind die  $T_4$ -Konzentrationen im Serum letztlich nicht mehr messbar.

Bei einer Behandlung mit  $24\mu\text{g } T_4$  sind die  $T_4$ -Konzentrationen im Serum signifikant erhöht, die  $T_3$ -Konzentrationen aber nicht. Dies erklärt sich durch einen Autoregulationsmechanismus, der bei  $T_4$ -Gabe die Typ 2 Dejodase, die  $T_4$  zu  $T_3$  abbaut, hemmt und gleichzeitig die Typ 3 Dejodase, welche  $T_4$  zu  $rT_3$  und  $T_3$  zu  $3,3'T_2$  dejodiert, stimuliert. Daher entsteht weniger  $T_3$ , obwohl  $T_4$  im Serum bereits erhöht ist. Außerdem wird die Typ 1 Dejodase gesteigert, die einmal  $T_4$  zu  $T_3$  abbaut, aber auch  $T_4$  zu  $rT_3$  und  $rT_3$  zu  $3,3'T_2$  dejodiert. Mithilfe dieser Autoregulation gelingt es, die Serumkonzentrationen von  $T_3$  trotz erhöhter  $T_4$ -Konzentration noch möglichst lange im physiologischen Bereich zu halten.

Die Behandlung mit  $96\mu\text{g } T_4$  erhöht die  $T_4$ -Serumkonzentrationen derart, dass der Autoregulationsmechanismus jedoch nicht mehr ausreicht, um die  $T_3$ -Konzentrationen konstant zu halten. Daher sind auch die  $T_3$ -Konzentrationen im Serum erhöht.

### 5.1.2 Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Homogenat und in subzellulären Fraktionen verschiedener Rattenhirnareale

Bei der hypothyreoten Stoffwechsellage sind im Homogenat der untersuchten Hirnareale stark erniedrigte bzw. keine  $T_3$ - und auch  $T_4$ -Konzentrationen messbar. Eine Besonderheit des Schilddrüsenhormongleichgewichts im Gehirn besteht darin, dass in diesem Organ ca. 70 bis 80 % des  $T_3$  durch lokale, intrazelluläre Dejodierung aus  $T_4$  entstehen (CRANTZ et al., 1982, van DOORN et al., 1984). Im Gegensatz dazu wird in anderen Organen wie z. B. der Lunge oder der Leber der Großteil des  $T_3$ -Gehaltes direkt aus dem Blut aufgenommen. (siehe auch Kap 2.1.4). Daher sind die  $T_4$ -Serumkonzentrationen von wesentlicher Bedeutung für die  $T_3$ -Konzentrationen im ZNS. Da bei der Hypothyreose die Konzentrationen von  $T_4$  im Serum nicht mehr messbar waren, stand kein  $T_4$  mehr für eine  $T_3$ -Synthese im ZNS zur Verfügung.

Im Gegensatz zu den Ergebnissen im Serum zeigen die  $T_3$ -Konzentrationen im Homogenat der verschiedenen Hirnareale (mit Ausnahme des Mittelhirns, siehe unten) nach einer Behandlung mit  $T_3$  als auch mit  $T_4$  (96 $\mu$ g) keine Veränderung im Vergleich mit den Kontrolltieren. Bei einer Behandlung mit niedrig dosiertem  $T_4$  finden sich in zwei Arealen (parietaler Kortex und Amygdala) sogar erniedrigte  $T_3$ -Konzentrationen. Dies lässt sich möglicherweise durch einen „überschießenden Autoregulationsmechanismus“ erklären, der bei erhöhtem Angebot von  $T_4$  die Aktivität der D2 senkt, wodurch weniger  $T_3$  aus  $T_4$  gebildet wird. Gleichzeitig wird die Aktivität der D3 erhöht und somit vermehrt  $T_4$  zu  $rT_3$  abgebaut bzw.  $T_3$  zu  $3,3'T_2$ , um angesichts dieser unphysiologisch hohen Serum- und Gewebe- $T_4$ -Konzentrationen die  $T_3$ -Konzentrationen im Gewebe möglichst lange konstant zu halten. (Befunde z. B. bei LEONARD et al., 1981, BURMEISTER et al., 1997, Übersicht bei LEONARD und KÖHRLE, 2000). Wenn dieser Mechanismus zu stark ausgeprägt wird, dann könnten dies sogar erniedrigte  $T_3$ -Konzentrationen zur Folge haben. Auch eine übermäßige Aktivierung der D3 würde die  $T_3$ -Konzentrationen erniedrigen. Es ist jedoch nicht geklärt, warum dieser Autoregulationsmechanismus und die daraus resultierende überschießende Reaktion der Enzyme gerade in diesen beiden Gehirnarealen so ausgeprägt sind. Ein möglicher Zusammenhang wäre mit der Verteilung der Dejodasen in den Arealen zu sehen (siehe Kap. 2.1.4).

Im Mittelhirn funktioniert dieser Autoregulationsmechanismus wahrscheinlich nicht in dem gleichen Maße. BAUMGARTNER et al. (1994) fanden heraus, dass im Mittelhirn die Aktivitäten der 5'II-Dejodase (D2) und der 5 III-Dejodase (D3) im Gegensatz zu anderen Arealen erniedrigt sind. Daher sind in der vorliegenden Studie bei einer hyperthyreoten

Stoffwechsellage die  $T_3$ -Konzentrationen im Homogenat des Mittelhirns der mit  $T_3$  und der mit  $96\mu\text{g } T_4$  behandelten Tiere erhöht (wie im Serum, siehe Kap. 4.1.1 und 4.1.2). Diese Ergebnisse zeigen, dass besonders Areale, in denen die  $D_3$ -Aktivität gering ist wie z.B. im Mittelhirn, nicht gut gegen eine Hyperthyreose geschützt sind.

Bei einer Hyperthyreose mit  $T_3$  sind signifikant erniedrigte oder keine  $T_4$ -Konzentrationen im Homogenat der Rattenhirnareale messbar (siehe Abb. 4.3-4.6). Dies erklärt sich durch ein negatives Feedback, wodurch kein  $T_4$  mehr aus der Schilddrüse ins Blut sezerniert wird und somit ins Gehirn aufgenommen werden kann (siehe Kap.5.1.1). Nach der Behandlung mit  $T_4$  und der daraus resultierenden Erhöhung der  $T_4$ -Konzentrationen im Serum sind die  $T_4$ -Konzentrationen in den Homogenaten der untersuchten Hirnareale signifikant erhöht.

Bei der Betrachtung der Ergebnisse der Messung der  $T_3$ -Konzentrationen unter euthyreoten Bedingungen finden sich in der Nukleifraktion aller untersuchten Hirnareale mit Ausnahme des Mittelhirns deutlich höhere Konzentrationen als im Homogenat und in den anderen Subfraktionen. Dies ist nicht unerwartet, da die Nuklei eine hohe Dichte an  $T_3$ -Rezeptoren aufweisen und die meisten bisher bekannten physiologischen Effekte von Schilddrüsenhormonen über nukleäre  $T_3$ -Rezeptoren vermittelt werden. (siehe Kap. 2.2.1).

Bei einer Hypothyreose sind in den Subfraktionen aller vier untersuchten Areale die nukleären  $T_3$ -Konzentrationen signifikant erniedrigt (frontaler und parietaler Kortex) oder nicht mehr messbar (Mittelhirn und Amygdala). Das heißt vermutlich, dass die über die wichtigen nukleären  $T_3$ -Rezeptoren vermittelte Genexpression im hypothyreoten Zustand bei diesen vier Arealen vermindert ist.

Sowohl die Hyperthyreose mit  $T_3$  als auch die Behandlung mit  $T_4$  unterschiedlicher Konzentrationen führten zu keinen signifikanten Änderungen der  $T_3$ -Konzentrationen in den Nuklei des frontalen Kortex. Im parietalen Kortex sind erniedrigte  $T_3$ -Konzentrationen im Homogenat gemessen worden, in den Nuklei ist eine tendenzielle, aber keine signifikante Erniedrigung erkennbar. Im Mittelhirn sind die  $T_3$ -Konzentrationen bei den mit  $T_3$  und mit  $96\mu\text{g } T_4$  behandelten Tieren in den Nuklei erhöht und in der Amygdala bei  $24\mu\text{g } T_4$  erniedrigt.

Die Ergebnisse zeigen, dass die Messungen der  $T_3$ -Konzentrationen in den Subfraktionen keine zusätzlichen Informationen gebracht haben. Die  $T_3$ -Konzentrationen der untersuchten Subfraktionen verhalten sich mit wenigen Ausnahmen wie im Homogenat.

Der Vergleich der  $T_4$ -Konzentrationen im Homogenat und der in den einzelnen Subfraktionen zeigt bei der Hypothyreose keine große Abweichung. Es finden sich dort signifikant erniedrigte oder nicht messbare  $T_4$ -Konzentrationen.

Die  $T_4$ -Gewebekonzentrationen in den Subfraktionen bei den mit  $T_3$  behandelten Tieren entsprechen denen des Homogenats (s.o. negatives Feedback). Das gleiche Ergebnis zeigen die  $T_4$ -Konzentrationen bei den mit  $T_4$  behandelten Tieren.

Aufgrund der nachgewiesenen  $T_4$ -Konzentrationen in den Subfraktionen stellt sich die Frage der Funktion des  $T_4$  in diesen subzellulären Strukturen: bisher findet sich in der Literatur kein Nachweis über spezifische Bindungsstellen oder Rezeptoren für  $T_4$  an den Subfraktionen. So könnte (1) die Bindung von  $T_4$  an diese Subfraktionen von bislang noch nicht bekannter funktioneller Bedeutung sein, (2)  $T_4$  in die Zelle gelangen und intrazellulär an den entsprechenden subzellulären Strukturen zu  $T_3$  dejodiert werden oder (3)  $T_4$  intrazellulär über z.B. eine hydrophobe Bindung ohne funktionelle Bedeutung an diese Subfraktionen binden.

## **5.2 Experimente 2-4: Effekte verschiedener Stressoren auf die Schilddrüsenhormonkonzentrationen ( $T_3/T_4$ )**

### **5.2.1 Experiment 2: Schilddrüsenhormonkonzentrationen nach subchronischem Stress**

Im Gegensatz zu den Ergebnissen bei Hypo- und Hyperthyreose (siehe Experiment 1, Kap. 4.1) wurden bei subchronischem Stress keine Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum gefunden. Diese Ergebnisse erklären die bisher allgemein angenommene Aussage, Schilddrüsenhormone nicht zu den Stresshormonen zu zählen, da sich ihre Konzentrationen im Gegensatz zum Cortisol bei Stresssituationen im Blut nicht messbar verändern.

Wie in unseren Untersuchungen gezeigt wurde, gibt es trotz der fehlenden Veränderungen der Schilddrüsenhormonkonzentrationen im Serum (Abb. 4.11 und 4.12) deutliche Effekte in verschiedenen subzellulären Fraktionen des Rattenhirns. Nur in einem der sieben untersuchten Hirnareale war eine erhöhte  $T_3$ -Konzentration im Homogenat messbar (Hippocampus). Dagegen zeigten in der nukleären Fraktion vier von sieben Hirnarealen (57,14%) eine signifikante Abnahme der  $T_3$ -Konzentrationen (frontaler Kortex, Amygdala, Septum und Hypothalamus). Dieses konsistente Ergebnis macht deutlich, dass die Veränderungen der nukleären  $T_3$ -Konzentrationen nicht hätten quantifiziert werden können, wenn  $T_3$  nur im Homogenat gemessen worden wäre.

Nur geringgradig signifikant erhöhte  $T_3$ -Konzentrationen waren im Myelin und in der Mikrosomenfraktion des Hypothalamus (Abb. 4.19) gemessen worden. Diese nur in einem

Hirnareal gefundenen Ergebnisse, wie z. B. auch die alleinige Erhöhung der  $T_3$ -Konzentrationen im Hippocampus, müssen in einer unabhängigen Untersuchung repliziert werden, bevor sie als gesichert angenommen werden können. Denn im Rahmen dieser Arbeit wurde eine große Zahl an statistischen Berechnungen durchgeführt. Bei einem Signifikanzniveau von  $p < 0,05$  ist zu erwarten, dass fünf von hundert Ergebnisse falsch klassifiziert werden, ein Teil davon als „falsch signifikant“ und der andere Teil ebenso fälschlich als nicht signifikant. „Isolierte“ Einzelergebnisse, die nur in einer Subfraktion beobachtet werden, sollten daher in einer weiteren Untersuchung bestätigt werden, während konsistente Ergebnisse quer durch verschiedene Areale als glaubwürdig erscheinen (z. B. die Abnahme der  $T_3$ -Konzentrationen in vier von sieben Hirnarealen nach 14-tägigem Stress). In weiteren Versuchen müsste untersucht werden, welche Genexpression durch diese Form von Stress beeinflusst wird bzw. welche dieser Effekte über  $T_3$  vermittelt werden. Außerdem ist an diesem Befund auffällig, dass eine routinemäßig im Rahmen von Tierexperimenten angewandte Prozedur, z.B. eine intraperitoneale Applikation von Kochsalzlösung, über eine verminderte nukleäre  $T_3$ -Konzentration die Genexpression bereits bei Kontrolltieren beeinflusst. Aus diesem Grund erscheint es wichtig, über alternative Darreichungsformen von Medikamenten, wie beispielsweise über das Trinkwasser oder über das Futter, nachzudenken.

Die einzig messbaren Veränderungen der  $T_4$ -Konzentrationen betrafen das Homogenat des Mittelhirns, die Myelinfraktion des Hypothalamus und die Synaptosomenfraktion des parietalen Kortex (siehe Kap. 4.2.1.3). Da es sich hierbei wiederum um isolierte Einzelergebnisse handelt, müssten zur Absicherung der Ergebnisse weitere Untersuchungen durchgeführt werden.

### **5.2.2 Experiment 3: Schilddrüsenhormonkonzentrationen nach akutem Stress**

Die Konzentrationen von  $T_3$  und  $T_4$  zeigen nach Einwirkung von akutem Stress keine Veränderungen im Serum und gleichen somit den Ergebnissen der Untersuchungen nach subchronischem Stress (siehe Experiment 2).

Aufgrund der Befunde der  $T_3$ -Konzentrationen im frontalen Kortex bei subchronischem Stress wurden Schilddrüsenhormonkonzentrationen auch bei akutem Stress im Homogenat und in verschiedenen Subfraktionen in diesem Hirnareal untersucht. Dieser führte zu einer signifikanten Erhöhung der  $T_3$ -Konzentration im Homogenat (Abb. 4.29). Erstaunlicherweise

waren jedoch die  $T_3$ -Konzentrationen in keiner der untersuchten Subfraktionen verändert. Dieser Befund lässt Zweifel daran aufkommen, ob die stressinduzierte Veränderung der  $T_3$ -Konzentrationen tatsächlich von physiologischer Relevanz ist. Es ist jedoch nicht auszuschließen, dass Veränderungen der  $T_3$ -Konzentrationen einzelner Subfraktionen erst nach Ablauf einer bestimmten Zeitspanne auftreten und somit hier noch nicht gemessen werden konnten. Diese Vermutung wird gestützt durch die signifikant erniedrigten  $T_3$ -Konzentrationen in der nukleären Subfraktion bei subchronischem Stress (siehe Abb. 4.13 und 4.17-4.19).

Ob schließlich das isolierte Einzelergebnis, das eine Abnahme der  $T_4$ -Konzentrationen im Myelin des frontalen Kortex nach den i.p.-Injektionen darstellt (Abb. 4.30), physiologisch bedeutsam ist oder eher einen „statistischen Artefakt“ darstellt, kann hier nicht beurteilt werden.

### **5.2.3 Experiment 4: Schilddrüsenhormonkonzentrationen nach achtstündigem Schlafentzug**

Auch die Untersuchung der Schilddrüsenhormone nach achtstündigem Schlafentzug zeigten keine Veränderungen der Serumkonzentrationen (Abb. 4.31 und 4.32). So lässt sich daraus schließen, dass die Art und die Dauer des Stresses keinen Einfluss auf die Konzentrationen von sowohl  $T_3$  als auch  $T_4$  im Serum haben.

Nach einem Schlafentzug findet man bei den Schilddrüsenhormonen im Gewebe folgende Veränderungen: die  $T_3$ -Konzentrationen im Homogenat nehmen in drei von vier untersuchten Hirnarealen signifikant zu, wogegen die  $T_4$ -Konzentrationen des Homogenats in allen drei untersuchten Arealen signifikante Abnahmen zeigen. Das heißt, dass hier offenbar durch den Schlafentzug  $T_4$  zu  $T_3$  umgewandelt wird.

Die Bestimmung der  $T_4$ -Konzentrationen in der Amygdala sowohl bei der Kontrollgruppe als auch bei den Versuchstieren ergaben nicht messbare Werte. Dies ist darauf zurückzuführen, dass in der Amygdala die niedrigsten Schilddrüsenhormonkonzentrationen vorkommen. Auch in den oben beschriebenen Untersuchungen (siehe Experiment 2 und 3) wurden in der Amygdala sehr niedrige und zum Teil nicht mehr messbare Schilddrüsenhormonkonzentrationen (insbesondere  $T_4$ ) nachgewiesen.

Betrachtet man die Veränderungen der  $T_3$ -Konzentrationen, so fällt auf, dass nach einem Schlafentzug in den Synaptosomen des parietalen Kortex und der Amygdala ein signifikanter Anstieg zu verzeichnen ist. Auch in den Arealen frontaler Kortex und Hippocampus ist ein

tendenzieller Anstieg von  $T_3$  zu erkennen. Dagegen sind bei allen Hirnarealen in der nukleären Fraktion keine signifikanten Veränderungen der  $T_3$ -Konzentrationen gemessen worden. Falls die Erhöhung von  $T_3$  nach Schlafentzug eine physiologische Rolle spielt, dann vermutlich nicht über Wirkung an nukleären Rezeptoren wie beim subchronischen Stress (siehe Kap. 5.2.1), sondern möglicherweise durch eine spezifische Wirkung an den Synaptosomen. Um diese Hypothese zu bestätigen sind weitere Untersuchungen hinsichtlich des Wirkungsmechanismus von  $T_3$  an subzellulären Fraktionen bei Schlafentzug nötig.

### **5.3 Methodische Überlegungen**

#### **5.3.1 Reinheit der subzellulären Fraktionen**

Die Reinheit der subzellulären Fraktionen wurde mithilfe elektronenmikroskopischer Untersuchungen sowie durch die Bestimmung verschiedener subzellulärer Marker überprüft (siehe Kap.3.5.3.9). Wie die Ergebnisse zeigen, liegen die einzelnen Subfraktionen in hoher Reinheit vor. Zudem waren die Konzentrationen der subzellulären Marker in der jeweiligen Fraktion um ein vielfaches höher als jene im Homogenat. Daher können signifikante Effekte bei den einzelnen subzellulären  $T_3$ -Konzentrationen nicht durch Verunreinigung dieser Fraktionen verursacht werden. Die einzige nennenswerte Kontamination bestand im Bereich der Mitochondrien, deren Markerenzym (Succinatdehydrogenaseaktivität) auch in nennenswerten Konzentrationen in den Synaptosomen gemessen wurde. Dies ist auch so zu erwarten, da Synaptosomen eine größere Anzahl von Mitochondrien enthalten.

#### **5.3.2 Artificielle Umverteilungen von Schilddrüsenhormonen zwischen subzellulären Fraktionen**

Möglicherweise könnten sich auch zytosolische  $T_3$ -Moleküle im Laufe der Zentrifugation an lipophile Strukturen wie dem Myelin oder den Synaptosomen anheften und dann fälschlicherweise in diesen Fraktionen gemessen werden. Allerdings zeigen die selektiven Erhöhungen der  $T_3$ -Konzentrationen in ganz spezifischen Subfraktionen, dass es sich hierbei nicht um eine Umverteilung des  $T_3$  aus dem Homogenat handelt. So bewirkte beispielsweise die in Experiment 2 durchgeführte intraperitoneale Behandlung mit Kochsalzlösung in der Nukleifraktion in vier von sieben Hirnarealen im Gegensatz zum Homogenat signifikante Veränderungen der  $T_3$ -Konzentrationen (Kap. 4.2.1.3). Die Methode der

Schilddrüsenhormonquantifizierung in subzellulären Fraktionen erscheint daher valide und Umverteilungseffekte sind somit hier nicht wahrscheinlich.

Da in unserer Studie relativ große Hirnareale untersucht wurden, wie z.B. der parietale Kortex, welcher aus mehreren Schichten besteht, kann nicht ausgeschlossen werden, dass eine Veränderung der Schilddrüsenhormonkonzentrationen nur in einem kleinen Bereich dieses Areals aufgetreten ist, jedoch nicht quantifiziert werden konnte.

### **5.3.3 Durchführung des Schlafentzugs**

BORBELY und NEUHAUS (1979) beschrieben eine Methode des Schlafentzugs, bei welcher die Ratten einzeln für 24 Stunden in sich langsam drehenden Trommeln platziert werden. Diese Methode hat allerdings folgende Nachteile: Die Tiere werden zum einen isoliert von den anderen Tieren, was einen zusätzlichen Stressfaktor bedeutet. Zum anderen zwingt die anhaltende Rotation der Trommel die Tiere zu permanenter körperlicher Aktivität, was wiederum Effekte auf die zu untersuchenden Parameter haben könnte. Aus diesen Gründen wurde in der vorliegenden Arbeit der Schlafentzug nur über einen Zeitraum von acht Stunden durchgeführt (Experiment 4, siehe Kap.3.5.1.2.3). Außerdem verblieben die Tiere zu viert in einem Käfig und wurden durch verschiedene Manipulationen wach gehalten. Daher ist dieses Vorgehen als eine bessere Methode für die Untersuchung der Schlafentzugeffekte anzusehen als das von BORBELY und NEUHAUS beschriebene Modell. Der achtstündige Schlafentzug entspricht dabei ungefähr dem bei depressiven Patienten antidepressiv wirksamen partiellen Schlafentzug in der zweiten Nachthälfte.